

مطالعه اثر سایتوپاتیک آنزیم اوره آز هلیکوباکتریپیلوری بر کشت سلول هلا

نویسندگان: عزت نوری زاده^{۱*}، دکتر بهروز شکوهی^۲، دکتر کریم اله قاسمی گرمی^۳ و سعید لطیفی نوید^۴

۱. مربی گروه میکروبیولوژی دانشکده علوم دانشگاه محقق اردبیلی
 ۲. استادیار گروه میکروبیولوژی دانشکده علوم دانشگاه محقق اردبیلی
 ۳. استادیار گروه پاتوبیولوژی دانشگاه علوم پزشکی اردبیل
 ۴. دانشجوی دوره دکتری رشته ژنتیک پژوهشگاه ملی زیست فناوری
- * نویسنده مسئول: Email: nourizade@yahoo.com

چکیده

مقدمه و هدف: امروزه شواهد متعددی نشان می دهد که هلیکوباکتریپیلوری از عوامل مهم در ایجاد گاستریت مزمن و زخم معده و اثنی عشر است. این باکتری در لایه مخاطی دیده می شود و در مجاورت سلول های اپی تلیال قرار می گیرد و در آنجا، موجب تغییرات مخاطی، ناهنجاری های سلولی، ضایعات بافتی و التهاب می گردد. یکی از ویژگی های مهم این باکتری، تولید مقدار فراوان آنزیم اوره آز است. فعالیت آنزیم اوره آز می تواند یک عامل ویرولانسی مهم باشد که در کلنیزه شدن باکتری در مخاط معده و صدمه به مخاط نقش مهم دارد. هدف از این مطالعه، بررسی نقش آنزیم اوره آز در ایجاد ضایعات سلولی است.

روش تحقیق: بررسی روی ۱۰۰ نمونه بیوپسی صورت گرفت و برای نمونه ها، تست اوره سریع در محل اتاق آندوسکپی انجام شد. نمونه های بیوپسی در داخل محیط ترانسپورت به آزمایشگاه منتقل شده، روی محیط های انتخابی کشت داده شدند. سپس هویت باکتری های رشد کرده با استفاده از بررسی میکروسکوپی و تست های بیوشیمیایی تعیین گردید. کشت ۸۰ نمونه بیوپسی مثبت بود. اثر مستقیم سوپرناتانت حاوی آنزیم اوره آز استخراج شده از ۵۰ نمونه باکتریایی بر روی کشت سلول هلا بررسی شد. همچنین اوره با تراکم نهایی ۳/۷۵ و ۲۰ میلی مولار به همراه سوپرناتانت حاوی آنزیم، به محیط کشت سلول هلا اضافه گردید. به منظور بررسی عامل ایجاد کننده ضایعات سلولی از آمونیاک در PBS در تراکم های نهایی ۴۰، ۳۲، ۲۲، ۲۰، ۱۵، ۱۰، ۸، ۷ و ۳ میلی مولار استفاده شد.

یافته ها: در حضور آنزیم اوره آز و تراکم ۲۰ میلی مولار اوره، رنگ محیط کشت به صورت ارغوانی در آمد و این دگرگونی نشانه تولید آمونیاک به مقدار زیاد است. همچنین واکوئل های داخل سلولی تشکیل شدند. با اضافه کردن سوپرناتانت حاوی آنزیم اوره آز بدون حضور اوره، واکوئل داخل سلولی مشاهده نگردید. در تراکم کم تر از ۸ میلی مولار آمونیاک نیز واکوئل داخل سلولی مشاهده نگردید. از تراکم ۸ میلی مولار به بعد، اثر سایتوپاتیک به صورت واکوئل مشاهده شد و در تراکم ۴۰ میلی مولار آمونیاک، تخریب کامل لایه سلولی به وجود آمد.

بحث و نتایج: با توجه به نتایج تحقیقات به نظر می رسد آنزیم اوره آز، به طور مستقیم آسیب زننده نیست، بلکه آمونیاک ایجاد شده در اثر هیدرولیز اوره توسط آنزیم اوره آز است که ماده سمی است و موجب زخم معده و التهاب می گردد.

واژه های کلیدی: هلیکوباکتریپیلوری، آنزیم اوره آز، کشت سلول هلا، سایتوپاتیک

دوماهنامه علمی - پژوهشی
دانشگاه شاهد
سال سیزدهم - شماره ۶۲
اردیبهشت ۱۳۸۵

تاریخ وصول: ۸۳/۳/۲۴
تاریخ پذیرش: ۸۴/۹/۲۹

مقدمه

دانشمندی به نام بیزوزرو (Bizzozero) برای اولین بار در سال ۱۸۹۳ وجود میکروب های مارپیچی شکل را در معده سگ گزارش داد. در سال ۱۹۰۶ توسط کرینتیز (Krientiz)، این میکروارگانیسم ها در ضایعات نکرولی معده انسان مشاهده گردید و در سال ۱۹۸۳ از بیوپسی های معده جدا شد. در سال ۱۹۸۷ باکتری توسط دو دانشمند، یعنی گودوین (Goodwin) و مارشال (Marshall) به نام کمپیلوباکتر (Campylobacter) نامیده شد. با پیدایش این میکروارگانیسم، پنجره جدیدی برای بررسی پاتولوژی دستگاه گوارش بر روی پژوهشگران گشوده شد [۲۰].

هلیکوباکتریلوری یک باکتری گرم منفی، میکروآئروفیل، خمیده یا مارپیچی شکل، پر تحرک و لوفوتریکوس (Lophotrichous) است. در محیط های کشت آگاردار به شکل میله ای خمیده، و در کشت های کهنه یا ماندن پلیت در مجاورت هوا، باکتری به شکل کوکوبیدی است [۳،۴]. اکسیداز، کاتالاز، آورده از و آلکالین فسفاتاز مثبت است. جایگاه این میکروارگانیسم در مجرای معده روده ای لایه اپی تلیوم انسان بخصوص ناحیه آنتروم معده است. به ندرت از رکتوم، مری، مدفوع و از خون جدا می گردد [۲]. اخیراً در یک بررسی در روده بزرگ و کبد میمون رزوس مبتلا به بیماری های کلیت مزمن و هپاتیت، میکروب *Helicobacter Cinaedi* را به دست آورده اند [۵]. کورنلیوس (Cornelius) و همکاران او معتقدند که سیاه پوستان نسبت به سفیدپوستان آلودگی بیش تری را توسط هلیکوباکتریلوری از خود نشان می دهند [۲]. بررسی ها و تحقیقات جدید نشان داده که فورازولیدون نسبت به مترونیدازول برای درمان بیماری های ناشی از هلیکوباکتریلوری مؤثرتر است [۶،۷،۸].

نیکلاس کالاک (Nicolas Kalach) و همکارانش مشخص کردند که هلیکوباکتریلوری نسبت به داروهای مترونیدازول و کلاریترومایسین مقاومت بیش تری نشان می دهد [۹،۱۰]. التهاب مزمن فعال عامل بیماری زایی در اولسرپتیک به حساب می آید. به این علت برای حفاظت از سلول های اپی تلیال مخاطی، از بین بردن

میکروارگانیسم هلیکوباکتریلوری یکی از شرایط اصلی درمان است [۱۱،۱۲]. در هلیکوباکتریلوری فاکتورهای ویروالانس متعددی شناسایی شده است، از قبیل شکل اسپرل و قابلیت حرکت، کاتالاز، سیتوتوکسین و آنزیم آورده از [۱۱،۱۲]. در بین فاکتورهای مذکور، آنزیم آورده از به علت دارا بودن فعالیت شدید از اهمیت بالایی برخوردار است. بدین جهت در این بررسی به نقش آنزیم آورده از در ایجاد ضایعات سلولی در نمونه های مختلف و مقایسه آن ها پرداخته شده است.

مواد و روش ها

جمع آوری نمونه و کشت و تشخیص هویت:

نمونه های بیوپسی از ناحیه آنتروم بیماران مراجعه کننده به بیمارستان شریعتی تهران که تحت آندوسکوپی قرار می گرفتند تهیه و در داخل محیط ترانسپورت مکی تایو به آزمایشگاه منتقل شدند. تست آورده سریع برای بیوپسی ها در محل اتاق آندوسکوپی انجام شد. نمونه های بیوپسی بر روی محیط کشت تریپتیکیز - سوی آگار حاوی آنتی بیوتیک های وانکومایسین ۱۰ میلی گرم در لیتر، تریمتوپریم ۵ میلی گرم در لیتر، پلی میکسین-β ۰/۲۵ میلی گرم در لیتر و خون گوسفند ۱۰-۵ درصد، کشت داده شدند. پلیت ها در درون جار قرار گرفتند و شرایط میکروایروفیلیک و رطوبت کافی تأمین شد. پلیت ها به مدت ۷-۳ روز در دمای ۳۷°C گرمخانه گذاری شدند. سپس از کلنی های رشد کرده بر روی پلیت ها، رنگ آمیزی گرم تهیه شده، باکتری ها از لحاظ میکروسکوپی بررسی شدند. برای تأثیر نهایی، تست آورده از، اکسیداز، کاتالاز و حساسیت به آنتی بیوتیک ها در مورد باکتری ها انجام شد [۷].

مطالعه آسیب سلولی ناشی از آنزیم آورده از

هلیکوباکتریلوری

الف) آماده سازی باکتری و استخراج آورده از سطحی پس از ظاهر شدن کلنی های هلیکوباکتریلوری روی محیط انتخابی تریپتیکیز - سوی آگار، جدا کردن باکتری ها، و تعیین هویت آن ها توسط تست های بیوشیمیایی، سوسپانسیونی از باکتری به میزان ۲ میلی لیتر

مایع رویی که فیلتر کردیم و اوره با تراکم‌های ۳/۷۵ و ۲۰ میلی‌مولار را به‌منظور مقایسه شدت اثر آنزیم اوره‌آز به لوله‌ها اضافه کردیم.

۱. اوره در غلظت‌های مختلف همراه با محیط کشت نگهدارنده به سلول‌های هلا اضافه شد و به‌عنوان کنترل مورد استفاده قرار گرفت.
۲. مایع رویی (سوپر ناتانت) حاوی آنزیم اوره‌آز به همراه محیط کشت نگهدارنده به سلول‌های هلا اضافه شد و به عنوان کنترل مورد استفاده قرار گرفت.
۳. سلول‌های هلا به همراه محیط کشت نگهدارنده بدون اوره و آنزیم اوره‌آز نیز به عنوان کنترل مورد استفاده قرار گرفت.

بعد از ۲۴ ساعت گرمخانه گذاری، لامل‌ها خارج شده، به روش همتوکسلین، ائوزین رنگ‌آمیزی شدند. آزمایش‌ها در تراکم‌های مختلف اوره سه بار تکرار شد و نتایج حاصل مورد بررسی قرار گرفت.

د) تعیین عامل ایجادکننده ضایعات سلولی

برای این منظور از محلول آمونیاک در PBS، رقت‌های مختلف تهیه گردید. پس از تشکیل مونولایر و خالی کردن محیط کشت اولیه، و اضافه کردن ۱ میلی‌لیتر محیط کشت نگهدارنده، از تراکم نهایی آمونیاک ۴۰، ۳۲، ۲۳، ۲۰، ۱۵، ۱۰، ۸، ۷ و ۳ میلی‌مولار استفاده شد.

ه) بررسی اثر آنزیم اوره‌آز جک بین بر روی سلول‌های هلا برای بررسی اثر آنزیم اوره‌آز جک بین، ۱ میلی‌لیتر، محیط کشت نگه دارنده، ۰/۲ میلی‌لیتر از سوسپانسیون آنزیم اوره‌آز به میزان ۶۰ میلی‌گرم بر لیتر و اوره با تراکم نهایی ۳/۷۵ و ۲۰ میلی‌مولار به لوله‌های لامل‌دار اضافه شد [۱۶].

روش سنجش آنزیم اوره‌آز (روش توأم آنزیمی)

برای تهیه آنزیم، سوسپانسیونی از باکتری در بافر PBS (phosphate buffer saline) تهیه و جذب نوری آن در طول موج ۶۵۰ نانومتر اندازه‌گیری شد. سوسپانسیون باکتریایی سانتریفوژ شد و از مایع رویی استفاده گردید،

در فسفات بافرسالین (PBS) تهیه شد. در طول موج ۶۵۰ نانومتر جذب نوری (optical density) در محدوده ۰/۶ تنظیم شد و سپس لوله حاوی سوسپانسیون باکتریایی برای مدت کوتاهی روی یخ قرار داده شد. سوسپانسیون باکتریایی سانتریفوژ گردید ($\times g$ ۵۰۰۰، $4^{\circ}C$ ، ۲۰ دقیقه). دوباره رسوب باکتریایی را در ۲ میلی‌لیتر آب مقطر به حالت سوسپانسیون درآورده، سوسپانسیون باکتریایی به مدت ۶۰-۴۵ ثانیه ورتکس گردید. آنگاه دوباره سلول‌های باکتریایی با استفاده از سانتریفوژ رسوب داده شدند ($\times g$ ۱۰۰۰۰، ۲۰ دقیقه، $4^{\circ}C$). سوپرناتانت که حاوی آنزیم اوره‌آز است از رسوب جدا و از فیلتر ۰/۲۲ میکرومتر عبور داده شد [۷].

ب) کشت سلول (تهیه شده از بافت سلولی از انستیتو پاستور ایران)

سلول‌های هلا (Hela)، در محیط (dulbecco modified eagle's medium: DMEM) (شرکت سیگما) حاوی ۵ درصد سرم FCS (Fetal Calf Serum) (شرکت سیگما) در حضور ۵ درصد CO_2 ، در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد کشت داده شدند. سپس با تامل حاوی کشت سلول، محیط کشت را خالی کرده، لایه کشت سلولی با بافره‌نکس بدون کلسیم و منیزیم شستشو داده شد. آنگاه تریپسین یا تریپسین ورسن اضافه شد و بعد از مدت زمان لازم، زمانی که سلول‌ها در حال گرد شدن بودند، تریپسین را خالی کرده، سلول‌ها را در DMEM به حالت سوسپانسیون درآوردیم. از سوسپانسیون سلولی به میزان ۱/۵ میلی‌لیتر را داخل لوله‌های لامل‌دار (لیتون تیوپ) ریخته، در گرمخانه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد نگهداری کردیم. بعد از مونولایر شدن سلول‌ها که پس از گذشت ۲۴ ساعت صورت می‌گیرد، از آن‌ها برای بررسی اثر آنزیم اوره‌آز استفاده کردیم [۱۳، ۱۴ و ۱۵].

ج) بررسی ضایعات سلولی به‌صورت ایجاد واکوئل

پس از مونولایر شدن کشت‌های سلولی در لوله‌های لامل‌دار، محیط کشت سلولی را خارج کرده، به جای آن ۱ میلی‌لیتر محیط کشت نگهدارنده، ۰/۲ میلی‌لیتر از

معدۀ و اثنی عشر و ۳/۸۰ (۴ درصد) مورد از بیوپسی معدۀ بیماران مبتلا به سرطان معدۀ، جدا شده بود.

تأثیر آنزیم اوره آز در ۵۰ نمونه در حضور ۲۰ میلی مولار و ۳/۷۵ میلی مولار اوره، در روی کشت سلول مورد مطالعه قرار گرفت. در حضور ۳/۷۵ میلی مولار اوره تنها در ۶۵ درصد نمونه ها، واکوئل داخل سلولی تشکیل گردیده بود و در حضور ۲۰ میلی مولار اوره در کلیه نمونه ها واکوئل های داخل سلولی مشاهده گردید. گرمخانه گذاری سلول های هلا، با مایع رویی حاوی آنزیم اوره آز و ۲۰ میلی مولار اوره، باعث تغییر رنگ محیط به صورت ارغوانی تیره می گردد و این دگرگونی نشانه تولید آمونیاک زیاد است. همچنین واکوئل های داخل سلولی نیز تشکیل می گردد (جدول ۲ و تصویر ۱ و ۲). مایع رویی، حاوی آنزیم اوره آز به تنهایی قادر به ایجاد واکوئلاسیون سلول های هلا نیست.

همچنین اوره نیز در تراکم های ۳/۷۵ و ۲۰ میلی مولار، به تنهایی قدرت ایجاد واکوئل های داخل سلولی را ندارد. بررسی آنزیم اوره آز به دست آمده از جک بین نشان داد که این آنزیم در تراکم های ۳/۷۵ و ۲۰ میلی مولار اوره واکوئل داخل سلولی ایجاد می کند. نتایج حاصل از اضافه کردن آمونیاک در تراکم های مختلف به سلول های هلا و گرمخانه گذاری نشان می دهد تراکم کم تر از ۸ میلی مولار آمونیاک پس از ۲۴

الته مطابق با روش ذکر شده در استخراج اوره آز سطحی. دستگاه اسپکتروفتومتری توسط بافر کاکتیل (Cocktail Buffer) در طول موج ۳۴۰ نانومتر صفر شد. سپس محل آنزیم به میزان ۲۵ میکرولیتر به کووت شامل ۰/۹ میلی لیتر کاکتیل، ۲۵ میکرولیتر NADH، ۲۵ میکرولیتر گلوتامات دهیدروژناز و ۲۵ میکرولیتر آدنوزین دی فسفات (سیگما) اضافه شد. به منظور کنترل از آنزیم اوره آز جک بین استفاده شد [۱۶].

نتایج

از ۱۰۰ نمونه بیوپسی جمع آوری شده، ۸۰ نمونه مثبت مشخص گردید. نمونه های مثبت به دست آمده، از لحاظ خواص بیوشیمیایی بررسی شدند. همه ۸۰ نمونه، از لحاظ اکسیداز، کاتالاز و اوره آز مثبت بودند و همچنین حساسیت به سفالوتین و مقاومت به نالیدیکسیک اسید داشتند.

بررسی باکتری در لام های مستقیم و پاتولوژی انجام شد. در ۷۵ درصد لام های مستقیم و در ۸۰ درصد لام های پاتولوژی هلیکوباکتریلوری مشاهده گردید (جدول ۱).

از ۸۰ نمونه مثبت به دست آمده، ۳۸/۸۰ (۴۷ درصد) مورد از بیوپسی معدۀ مبتلا به گاستریت، ۳۹/۸۰ (۴۹ درصد) مورد از بیوپسی معدۀ بیماران مبتلا به زخم

جدول ۱ نتایج بررسی HP در لام های مستقیم و پاتولوژی در ۸۰ نمونه

جمع کل		عدم مشاهده HP		مشاهده HP		لام های میکروسکوپی
درصد	تعداد	درصد	تعداد	درصد	تعداد	
۱۰۰	۸۰	۲۵	۲۰	۷۵	۶۰	لام مستقیم
۱۰۰	۸۰	۲۰	۱۵	۸۰	۶۵	لام پاتولوژی

جدول ۲ مقایسه نتایج حاصل از اضافه کردن سوپرناتانت حاوی آنزیم اوره آز

رنگ ارغوانی تیره	تولید آمونیاک	ایجاد واکوئل های داخل سلولی	مشاهده HP در داخل سلول
+	+	+	+
-	-	-	-

با اضافه کردن سوپرناتانت حاوی آنزیم اوره آز در محیط ۲۰ میلی مولار اوره

با اضافه کردن سوپرناتانت حاوی آنزیم اوره آز بدون حضور اوره

ساعت و ۴۸ ساعت، واکوئلاسیون داخل سلولی ایجاد نمی‌کند. از تراکم ۸ میلی‌مولار، به تدریج اثر سیتوپاتیک به صورت ایجاد واکوئل‌های داخل سلولی افزایش می‌یابد. در تراکم ۲۲ میلی‌مولار آمونیاک تعداد کمی از سلول‌ها، لیز شده و در تراکم‌های ۳۲ و ۴۰ میلی‌مولار آمونیاک لیز شدن کامل لایه سلولی صورت می‌گیرد. میزان تخریب لایه سلولی با بررسی لامل‌های رنگ‌آمیزی شده با همتوکسیلین و اتوزین توسط پاتولوژیست مشخص شد.

نتایج به دست آمده از بررسی بیوشیمیایی آنزیم اوره‌آز باکتری

فعالیت آنزیم اوره‌آز تمام سویه‌ها بر مبنای میکرومول (NADH) اکسید شده به دقیقه به جذب نوری سوسپانسیون اولیه باکتری وابسته است. میانگین فعالیت آنزیم حدود ۰/۰۷۷۱ است (جدول ۴).

جدول ۴ فعالیت آنزیم اوره‌آز ۱۰ نمونه هلیکوباکتریلوری

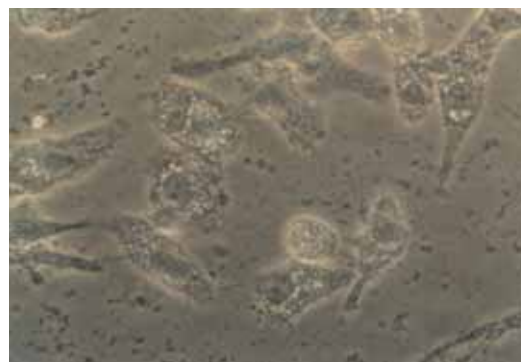
تعداد نمونه	فعالیت آنزیم
۱	٪۹۷۵
۱	٪۷۲۸
۱	٪۹۶۴
۱	٪۶۷۹
۱	٪۴۹۵
۱	٪۵۴۹
۱	٪۹۹۶
۱	٪۸۴۹
۱	٪۸۸۴
۱	٪۵۹۳
۱۰	جمع

بحث

آنزیم اوره‌آز، فاکتور مهمی در پاتوژنز هلیکوباکتریلوری محسوب می‌شود. در کشت سلول در حضور آنزیم اوره‌آز همراه با اوره، سیتوتوکسی سیتی در سلول‌ها به صورت ایجاد واکوئل مشاهده می‌شود. آنزیم اوره‌آز به طور مستقیم آسیب زننده نیست، بلکه آمونیاک ایجاد شده در اثر هیدرولیز اوره، توسط آنزیم اوره‌آز است که ماده سمی



تصویر ۱ گرمخانه‌گذاری سلول‌های هلا همراه با محیط کشت نگهدارنده بدون اوره‌آز و اوره (کنترل منفی) (×۴۰۰)



تصویر ۲ گرمخانه‌گذاری سلول‌های هلا با مایع رویی حاوی آنزیم اوره‌آز هلیکوباکتریلوری و اوره ۲۰ میلی‌مولار. واکوئل‌های داخل سلولی و تغییرات سیتوپلاسمی کاملاً مشخص است (×۴۰۰).

جدول ۳ رابطه تراکم‌های مختلف آمونیاک با تخریب سلولی و ایجاد واکوئل‌های داخل سلولی

غلظت آمونیاک (میلی‌مولار)	تشکیل واکوئل داخل سلولی	تخریب لایه سلول
کم‌تر از ۸	واکوئل داخل سلولی تشکیل نگردید	عدم تخریب لایه سلولی
۸-۲۰	واکوئل داخل سلولی تشکیل گردید	عدم تخریب لایه سلولی
۲۲	واکوئل داخل سلولی تشکیل گردید	تخریب جزئی لایه سلولی
۳۲	واکوئل داخل سلولی تشکیل گردید	تخریب قسمت عمده لایه سلولی
۴۰	واکوئل داخل سلولی تشکیل گردید	تخریب کامل لایه سلولی

است و قادر به ایجاد واکوئل داخل سلولی است. کاور و همکارانش (Cover et al) مطالعه‌ای در مورد ایجاد واکوئل داخل سلولی براساس جذب سریع قرمز خنثی به داخل واکوئل‌ها انجام دادند و با افزایش جذب قرمز خنثی که با اضافه کردن اوره به محیط در حضور آنزیم صورت می‌گرفت، نشان دادند که جذب قرمز خنثی توسط آنزیم اوره‌آز با واسطه آمونیاک صورت می‌گیرد [۱۳]. در نتیجه، آمونیاک حاصل از فعالیت آنزیم اوره‌آز هلیکوباکتریلوری می‌تواند در ایجاد آثار سیتوپاتیک نقش داشته باشد. در این صورت، فعالیت ارولیتیک‌باکتری در پاتوژن‌گاستریت و زخم پپتیک مهم است [۳]. مشخص شده که در افراد آلوده به هلیکوباکتریلوری، تراکم آمونیاک بالا و میزان اوره، در شیره معده پایین است؛ ولی در افراد غیرآلوده و پس از درمان بیماران آلوده با آنتی‌بیوتیک‌ها، این نسبت کاملاً معکوس است [۱۷]. مطالعات انجام یافته نشان می‌دهد که آمونیاک سبب کاهش در اختلاف پتانسیل مخاط شده، صدمه به سلول‌های اپی‌تلیال را افزایش می‌دهد. بررسی‌های مختلف نشان می‌دهد که واکوئل داخل سلولی در سلول‌های اپی‌تلیال مخاط معده افراد آلوده به هلیکوباکتریلوری وجود دارد و مشخص شده که آمونیاک حاصل از فعالیت آنزیم اوره‌آز هلیکوباکتریلوری، حاصل ایجاد آثار سیتوپاتیک در سلول‌های اپی‌تلیال بخش فوقانی دستگاه گوارش است [۱۸].

مارشال و کاور در یک تحقیق، میزان آمونیاک موجود در شیره معده افراد آلوده به هلیکوباکتریلوری را در حدود ۵۰-۱۸ میلی‌مولار بر لیتر گزارش کردند و ما نیز در بررسی خود، نزدیک به همین مقدار از آمونیاک استفاده کردیم و تأثیر تخریب سلولی را مشاهده کردیم [۱۳ و ۱۷]. هرچه مقدار آمونیاک در معده زیادتر شود به همان نسبت بر شدت التهاب معده افزوده می‌گردد. بررسی انجام شده، در نمونه بیوپسی معده بیمار مبتلا به گاستریت که آلوده به هلیکوباکتریلوری است، نشان داده که سلول‌های آسیب‌دیده درصدهای یکسانی نشان نمی‌دهند. چنین به نظر می‌رسد که یکی از عوامل این امر، اختلاف در مقدار آمونیاک باشد که ناشی از میزان متفاوت اوره‌ای است که در میکروایوانیرومنت (micro environment) باکتری در

اختیار آن قرار می‌گیرد [۱۹]. در این مطالعه نیز نشان داده شد که میزان اوره در آسیب سلولی مؤثر است. التهاب مزمن فعال به عنوان عامل بیماری‌زایی در زخم معده به حساب می‌آید. بدین علت برای محافظت از سلول‌های اپی‌تلیال مخاطی از بین بردن و ریشه‌کنی هلیکوباکتریلوری یکی از شرایط اصلی درمان است.

منابع

1. Bizzozero, Ueber die schlauch formigen drusen des magendarmk anals ... G. Archiv. F. Micro. Anatomie, 1893. 42,82-94.
2. J. Calam, *helicobacter pylori*, Bailliere's Clinical Gastroenterology, 1995; (3): 415-637.
3. Goodwin C.S., et al, Microbiological aspects of *helicobacter pylori*, Eur-J. Clin. Microbiology, 1990: 1-13.
4. Ren-z; Dang-G; Cocoid from of *helicobacter cinaedi* can be viable; Microbios. 1999; 97 (388): 153-63.
5. J. G. Fox, L. Handt, Isolation of *helicobacter pylori* from the colon, Liver of a Rhesus Monkey with chronic colitis and Hepatitis, JCM, 2001, Vol. 39, No: 4, pp.1580-85.
6. Dani R, et al. Omeprazole, Clarithromycin and furazolidon for the eradication of *helicobacter pylori* in patients with duodenal ulcer. Aliment pharmacol ther, 1999, 13: 1647-520.
7. Dunn,B. E.,G. P.Campbell, G. I. Perez – Perez, and M. J. Blaster, Purification and characterization of urease from *helicobacter pylori*. J. Biol. Chem. 1990. 265: 9464-69.
8. Malekzadeh R,Ansari R.et.Al., Furazolidone versus metronidazole in quadrup therapy for eradication of *helicobacter pylori* in duodenal ulcer disease. Aliment Farmcol Ther. 2000, 14: 299-303.
9. Nicolas kalach, et.al., High Levels of Resistance to Metronidazole and clarithromycin in *helicobacter pylori*, Strain in children, JCM, 2001 Vol. 39, No: 1, pp.394 - 97.
10. Stephanie A, et al, PCR-Based diagnosis of *helicobacter pylori*, Infec. and Real-Time Determination of Clarithromycin Resis. JCM: 2001: 39(4) 1217-20.
11. Corneliuse P. et al. *helicobacter pylori* infection. Gastroenterology Clinics of North America, 1993: 22 (1); 1-204.
12. Di – silvio; Larish – J, Breath tests as a noninvasive diagnostic metod in *helicobacter pylori* infectinal. Rev – gastroenterd Mex. 1998; 63 (3): 135-42.
13. Cover, T. L., Marshall B. J., Characterization of and human serologic response to proteins in *helicobacter pylori* broth culture supernatants with vacuolizing cytotoxin activity. Infection and Immun, 1990: 58: 603-610.
14. Papini E, Bugnoli M, De Bernard M, Figura N, Rappuli R, montecuccoc. Bafilomycin A1 inhibits *helicobacter pylori* induced vacuolization of HeLa cells. Mol Microbiol 1993: 7: 323-7.
15. Cover L. T, et al. Characterization of HeLa cell Vacuoles induced by *helicobacter pylori* broth culture supernatant. Human Pathology 1992, 23: 1004-1010.
16. Worthington, Manual enzymes Related Biochemicals. 1988. PP: 338-340.
17. Marshall B. J., Cover, T. L., Urea hydolysis in patients in patients with campylobacter pyloridis infection. Lancet, 1986; i: 965-966.
18. Leunk, R. D., et al, Antibody to cytotoxin in infection by *helicobacter pylori*, J. Clin. Mic. 1990; 28: pp.1181-1184
19. Goodwin C. S., et al, Intracellular vacuolization caused by the urease of *helicobacter pylori*, J. Infect. Dis., 1990: 161: 1302-1304.